

白血球粘着能の定量的測定法とトロンボキサン A₂ の影響の検討

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

魚 谷 知 佳

白血球の血管内皮への粘着は、動脈硬化症や血栓症の進展に関与していると考えられる。ガラスビーズ管を用いた、白血球粘着能の定量的測定法を考案し、各種条件下での粘着能の変化を検討した。健康者よりヘパリン採血し、直ちにガラスビーズ管に0.3mlずつ注入後、37℃にて静置した。生理的食塩水0.3mlで0.01ml/秒の速度で管内血液を洗い出したものを検体とし、自動白血球測定装置で白血球数を算定した。静置前の白血球数をA、一定時間静置後の白血球数をBとし、白血球粘着率 $((A-B)/A \times 100\%)$ を算出するとともに、ギムザ染色、エステラーゼ二重染色にて粘着した白血球分画を調べた。白血球粘着率は静置後経時的に増加し、約60分後に一定値 $(40.7 \pm 3.4\%)$ に達した。各白血球分画の粘着率は、単球、好中球、好酸球、リンパ球の順に高値を示した。また、カルシウム拮抗剤や解糖系阻害剤の添加で白血球粘着率は著明に抑制され、白血球粘着にカルシウムや解糖系エネルギーが必要であることが示唆された。ヘパリン血から比重遠心法により分離し、磷酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)で洗浄した好中球も同様に粘着能を有し、白血球粘着には、血小板や血漿成分の存在が不可欠ではないことが示唆された。走査型電子顕微鏡でも、好中球が直接ガラス面上に偽足状突起を出したり、広がるように変形して粘着している様子が観察された。健康者に少量のアスピリン(1日40mg)、トロンボキサン A₂(thromboxane A₂, TxA₂)合成酵素阻害剤であるCV-4151を1日100mg、TxA₂受容体拮抗剤であるAA-2414を1日20mg、各々経口投与し、投与前後の白血球粘着率を測定したところ、いずれの薬剤でも投与後の白血球粘着率は有意に低下を示した。また、健康対象者より採取した血液を試験管内凝固させた後の血清中トロンボキサン B₂(thromboxane B₂, TxB₂)濃度をTxA₂産生能の指標とし、血漿中6-ケト-プロスタグランジン F_{1α}(6-keto-prostaglandin F_{1α}, 6-keto-PGF_{1α})濃度をプロスタサイクリン(prostacyclin, PGI₂)産生能の指標として測定したところ、少量アスピリン投与群ではTxA₂産生能が投与後に著明に低下したのに対し、PGI₂産生能の低下は軽度であった。TxA₂合成酵素阻害剤投与群でもTxA₂産生能は有意に低下したが、PGI₂産生能は個体差が大きく、全体としては増加傾向が認められた。これらの結果より、アラキドン酸代謝産物のうち、少なくともTxA₂には白血球粘着能亢進作用のあることが示唆され、本法は試験管内でも白血球粘着率の簡易測定方法として有用であった。

Key words leukocyte adhesion, platelet, atherosclerosis, aspirin, thromboxane A₂

血栓症の発現機序として、血管壁の異常、血流状態の異常、血液凝固性の亢進の三点が古くから指摘されているが、これらの異常に血球成分の作用が強く影響していることが報告されている。このうち1824年、初めて Dutrochet¹⁾が顕微鏡下の観察で白血球が血管内皮に粘着する現象を報告して以来、白血球が動脈硬化や血栓症の進展に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。動物実験では高コレステロール食を負荷し続けると、白血球、特に単球の血管内皮への粘着が亢進する²⁾ことや、粘着した好中球内の顆粒から放出される蛋白分解酵素や活性酵素がフィブネクチンなどの蛋白を分解し、さらに血管内皮を障害する³⁾ことが報告されている。臨床的にも、狭心症患者の冠動脈内皮下に単球やマクロファージが浸潤し、さらに脂質を貯留した泡沫細胞という形態に変化する⁴⁾ことや、脳血管障害慢性期の患者では、白血球の血管内皮への粘着能が亢進している⁵⁾など、動脈硬化の発症と白血球との関連を裏付ける

報告が数多く見られ、白血球数の増加が動脈硬化性疾患の危険因子の一つ⁶⁾とも考えられるようになってきている。また Ross は、動脈硬化は血管内皮、平滑筋細胞と、血小板、白血球(単球)との相互作用により進展するという仮説⁷⁾を提唱しているが、このうち血小板と白血球はそれぞれ異なる性質を有する反面、各種蛋白酵素の放出反応の他、アラキドン酸代謝産物の産生、粘着、凝集作用を有する点などの共通した作用も有している。これらのうち主に血小板、白血球で産生されるトロンボキサン A₂(thromboxane A₂, TxA₂)と白血球粘着能との関連に注目し、TxA₂の白血球粘着能に及ぼす影響を検討することを目的に、白血球粘着能の定量的測定法を考案した。現在に至るまでの試験管内での白血球粘着能測定方法は、マイクロプレート(microplate)法⁸⁾、毛細管(capillary tube)法⁹⁾、ナイロンファイバーカラム(nylon fiber column)法¹⁰⁾など、粘着する対象が異物面である場合と、血管切片標本や培養血管内皮細胞である場

平成5年11月2日受付、平成5年12月16日受理

Abbreviations: CD, cluster determinant; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; LFA-1, lymphocyte function associated antigen-1; LT, leukotriene; NaF, sodium fluoride; PBS,

合の二つに大別される。異物面への白血球粘着を、そのまま生体内での血管内皮への粘着のモデルとして考えることには異論のあるところと思われるが、培養内皮細胞とナイロンファイバーへの白血球粘着能を比較し、種々の条件下や薬物刺激で、両群の粘着能がほぼ同様の結果を示したとする報告¹¹⁾があり、簡易で標準化しやすい方法として異物面への白血球粘着能を検討することは、意義のあることと思われる。

著者はガラスビーズ管を用いて白血球粘着能の定量測定を行ない、次いでアスピリン、 TxA_2 合成阻害剤、 TxA_2 受容体拮抗剤を健常者に経口投与することにより、白血球粘着能に対する TxA_2 の影響について検討した。

対象および方法

1. 白血球粘着能の定量的測定方法

1. 全血における白血球粘着能の検討

健常者15例よりヘパリン加採血 (10u/ml) し、直ちに 0.3ml ずつガラスビーズ管内に注入後、37℃で孵置した。ガラスビーズ管 (医学書院機械、東京) は、従来の血小板粘着能測定用のもので、長さ 15cm、内径 2mm のビニールチューブ内に、直径 0.3~0.4mm のガラスビーズが 0.5g 充填されている。一定時間孵置後、経時的に生理的食塩水 0.3ml にて、10秒間かけて管内血液を洗い出したものを検体とし、自動血球数測定装置 (Coulter Counter Model Sjr, Coulter Electronics Ltd, Luton, England) で白血球数を算定した。孵置前の白血球数を A、孵置後の白血球数を B とし、白血球粘着率を以下に示す数式で算出し、各検体につき三回ずつ測定してその平均値を測定値とした (図 1)。

$$\text{白血球粘着率} = (A - B) / A \times 100(\%)$$

孵置前と90分孵置後の検体で塗抹標本を作成し、ギムザ染色、エステラーゼ二重染色にて、粘着した白血球分画を検討しその粘着能を比較した。また、上記の測定条件のうち以下に示す条件を変化させ、白血球粘着能の変化を検討した。

1) 孵置時間による変化

健常者15例を対象に37℃での孵置時間を10分から90分まで変化させ、経時的な白血球粘着率の変化を測定した。

2) ヘパリン濃度による変化

健常者5例より採血し、さまざまな量のヘパリンを加えてその血中ヘパリン濃度を、5u/ml, 10u/ml, 50u/ml, 100u/ml と変化させ、孵置後60分の白血球粘着率を測定した。

3) 孵置温度による変化

健常者5例よりヘパリン採血 (10u/ml) し、孵置温度を、4℃, 23℃, 37℃, 45℃と変化させ、孵置後60分の白血球粘着率を測定した。

4) 洗い出し速度による変化

健常者5例にて孵置後60分の白血球粘着率を測定する際、生理的食塩水 0.3ml を、それぞれ3秒から30秒かけて洗い出した場合と、一息に強く洗い出した場合とを比較した。

5) カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度による変化

健常者5例より採血したヘパリン血 (10u/ml) にカルシウム

キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (和光、大阪) を 1mg/ml の濃度で添加し、孵置後60分の白血球粘着率を測定した。次に、ヘパリン血に塩化カルシウム溶液を加え、血液検体の Ca^{2+} 濃度を過剰状態 (4~40mg/ml) にし、同様に粘着率を比較した。

6) フッ化ナトリウム (sodium fluoride, NaF) 添加による変化

健常者5例より採血したヘパリン血 (10u/ml) に、解糖系阻害作用を持つ NaF (和光、大阪) を 5~20mg/ml 添加し、孵置後90分の白血球粘着率を比較した。

以上の基礎的実験により白血球粘着能測定法に至適する条件を決定し、次の段階の実験へ進んだ。

2. 分離洗浄好中球における粘着能の検討

1) 好中球の分離方法 (比重遠心法)

13×100mm のプラスチック遠心管にファイコルハイパーク (Ficoll-Hypaque) 混合溶液 (大日本製薬、大阪) を 3.5ml 分取

Heparinized samples of blood is obtained from healthy donors

↓
Injected through glass beads columns

↓
Incubated at 37 °C

↓
Washed out by saline in volume of 0.3 ml at 0.03 ml/sec

↓
Number of leukocytes is counted

$$\% \text{ adherence} = \frac{A - B}{A} \times 100 (\%)$$

A : number of leukocytes of pre-incubated sample

B : number of leukocytes of post-incubated sample

Fig. 1. Method of measurement of leukocyte adherence. Heparinized whole blood was obtained from healthy donors, and injected into glass beads columns, which were then incubated for 0 to 90 minutes at 37°C. The blood in the columns before and after incubation was washed out by saline in volume of 0.3 ml at a speed of 0.03 ml/sec. The number of leukocytes of blood samples was counted and leukocyte adherence (%) was calculated by the formula as shown in the figure.

phosphate-buffered saline; PDGF, platelet derived growth factor: 6-keto-PGF₁α, 6-keto-prostaglandin F₁α; PGH₂, prostaglandin H₂; PGI₂, prostacylin; Tx, thromboxane; TxSI, thromboxane A₂ synthetase inhibitor; TxRA, thromboxane A₂ receptor antagonist

し、健常者より採血したヘパリン血 (10u/ml) を 6ml ずつ静かに重層した。室温で遠心分離器にのり、2000回転で30分間遠心後、パスツールピペットで好中球層を試験管に移す。磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) を加え室温で1500回転で10分間遠心し、上清を除去する洗浄操作を2回繰り返した後、PBS に再浮遊させ、白血球数を 4000~8000/mm³ に調整した。分離した細胞の好中球比率は $94.5 \pm 5.9\%$ で、リンパ球、単球の混入率は $2.9 \pm 3.7\%$ であった。

2) 粘着能測定

上記の方法で健常者10例より採取した好中球浮遊液を検体として、全血による白血球粘着能測定法と同様の方法で37℃での孵置における経時的な好中球粘着能を測定し、全血での好中球粘着能と比較した。

3) 血漿、血清の分離洗浄好中球粘着能への影響

健常者より採血したヘパリン血を3000回転で10分間遠心分離器にかけ、乏血小板血漿を採取した。また、健常者より採血した全血を試験管内で完全に凝固させた後、血清を分離した。次に、健常者5例から採取した好中球を、PBS、並びにこれらの好中球を分離した同一者のヘパリン血より採取した乏血小板血漿、および血清中に再浮遊させ、各々37℃での孵置後60分における白血球粘着率を測定し比較した。

II. 走査型電子顕微鏡による白血球粘着の観察

ヘパリン血、および好中球の PBS 再浮遊液をガラスビーズ管内に注入し、37℃で60分間孵置後、管内から取り出したガラスビーズを試料とした。この試料を2.5%グルタルアルデヒド混合緩衝溶液 (0.1M カマジル酸ナトリウム溶液, pH7.4) (和光) 中に入れ、1時間固定後、同溶液を交換し一晩4℃で冷蔵保存する。翌朝、カマジル酸ナトリウム緩衝溶液 (和光) に溶かした2%オスミウム酸 (和光) で1時間固定し、次いで、エチルアルコールを35%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%と濃度を上げながら、各溶液に10分間ずつ浸して脱水し、その後酢酸イソアミル (和光) に20分間浸してなじませる。臨界点乾燥装置で試料を乾燥させ、両面テープで試料台に装着させ、イオンスパッターリング装置内で金を蒸着後、走査型電子顕微鏡にて観察した。

III. アラキドン酸代謝阻害剤の経口投与による白血球粘着能および TxA_2 産生能、プロスタサイクリン ($\text{prostaglandin, PGI}_2$) 濃度の変化

I での結果を踏まえ、全血による測定方法で白血球粘着能測定条件を血液ヘパリン濃度 10u/ml, 孵置温度37℃, 孵置時間90分, 洗い出し速度0.3ml/10秒と設定し、以下の薬剤を各々健常者に経口投与し、その前後の白血球粘着能の変化を検討した。 TxA_2 産生能は、採血後、血液を37℃で60分間孵置し、完全に試験管内凝固させた後分離した血清中のトロンボキサン B_2 (thromboxane B_2 , TxB_2) 濃度を、また PGI_2 濃度は、クエン酸採血した血漿中の6-ケト-プロスタグランジン $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) 濃度を、ラジオイムノアッセイにて測定し指標とした。

1. アスピリンによる影響

検査前10日間、いかなる薬剤も服用していない健常者10例に、アスピリンを1日1回40mgを2週間連日経口投与し、その前後における白血球粘着能、 TxA_2 産生能、血漿 PGI_2 濃度を1週間毎に測定し、変化を検討した。

2. TxA_2 合成阻害剤 (CV-4151) による影響

同様に健常者6例に TxA_2 合成阻害剤である CV-4151 (武田薬品, 大阪) を1日1回100mgを2週間連日経口投与し、同項目を測定検討した。

3. TxA_2 受容体拮抗剤 (AA-2414) による影響

同様に健常者6例に、 TxA_2 受容体拮抗剤である AA-2414 (武田薬品) を1日1回20mg, 4日間連日経口投与し、同項目を測定検討した。

IV. 試験管内におけるアスピリンの影響

以上のアラキドン酸代謝阻害剤が、血小板と白血球のいずれの代謝経路を阻害することにより白血球粘着能が変化するかを調べるために、以下の検討を行った。

健常者より採血したヘパリン血 (10u/ml) と 2-1) の方法により得られた同一者の好中球の PBS 浮遊液に各々アスピリンを10mM 添加し、37℃で30分孵置後、同様に白血球粘着能を測定し比較した。

V. 統計処理

各群の測定結果は、平均±標準偏差で表示し、統計学的分析は Student の t 検定を用い、両側検定で危険率1%以下を有意差ありとした。

成 績

I. 白血球粘着能の定量的測定方法

1. 全血における白血球粘着能の検討

1) 孵置時間による変化

血液のヘパリン濃度 10u/ml, 孵置温度37℃, 洗い出し速度 0.3ml/10秒の条件下での白血球粘着能の測定では、孵置後10分から有意の白血球粘着が認められ、60分後には粘着率 $40.3 \pm 4.2\%$, 90分後には粘着率 $40.7 \pm 4.2\%$ とほぼ一定の値に達した (図2)。

2) ヘパリン濃度による変化

ヘパリン 5u/ml での粘着率は $34.0 \pm 7.0\%$, ヘパリン 10u/ml では $25.2 \pm 4.0\%$, ヘパリン 50u/ml では $20.5 \pm 4.1\%$, ヘパリン 100u/ml では $13.8 \pm 3.4\%$ と、検体のヘパリン濃度依存的に、白血球粘着率は低値を示した (図3)。

3) 孵置温度による変化

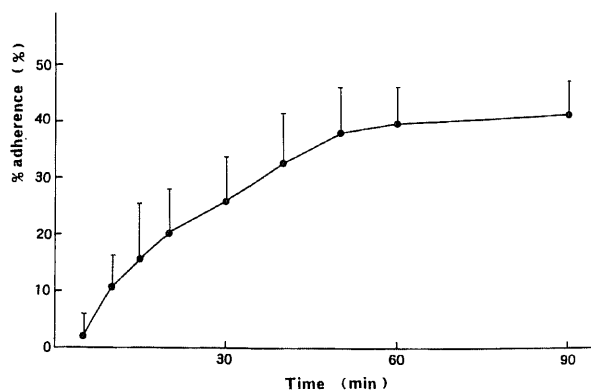


Fig. 2. Time course of leukocyte adherence of heparinized whole blood. Heparinized (10 u/ml) whole blood was obtained from normal donors, and injected into glass beads columns. After incubation for 0 to 90 minutes (abscissa) at 37℃, the columns were treated as shown in Fig. 1, and leukocyte adherence (% adherence on the ordinate) was determined. (n=15).

37℃での粘着率 $35.8 \pm 8.4\%$ に比し、4℃では $3.8 \pm 2.1\%$ 、23℃では $17.8 \pm 1.2\%$ 、45℃では $5.1 \pm 3.8\%$ と孵置温度により、白血球粘着率は有意に低下 ($p < 0.01$) を示した (図4)。

4) 洗い出し速度による変化

生理的食塩水0.3mlでの洗い出し速度0.1ml/秒以下では、安定した粘着率が得られた (図5)。

5) Ca^{2+} 濃度による変化

EDTAの添加により血液検体の Ca^{2+} をキレート化したところ、白血球粘着率は $4.3 \pm 2.3\%$ と著明に低下 ($p < 0.01$) した (図6A)。一方、 Ca^{2+} 過剰状態では、添加した Ca^{2+} 濃度が16mg/dl以上の場合、粘着率は有意に ($p < 0.01$) 低下した (図6B)。

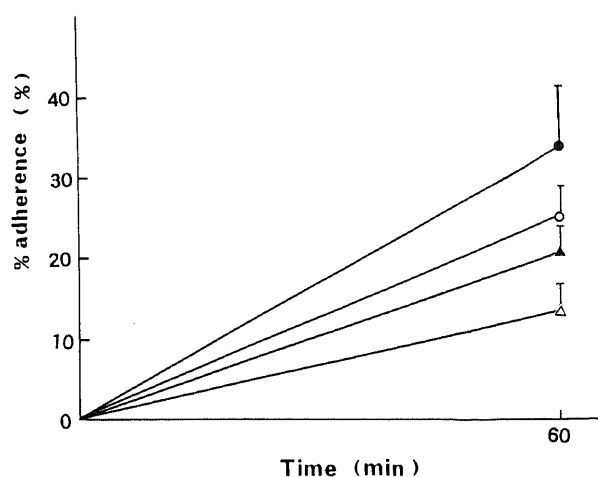


Fig. 3. Effect of heparin added to blood sample on the leukocyte adherence. Whole blood was heparinized at concentration of 5 u/ml (●), 10 u/ml (○), 50 u/ml (▲), and 100 u/ml (△). Leukocyte adherence (%) was determined after incubation of the columns for 60 min at 37℃ as shown in Fig. 1. ($n=5$).

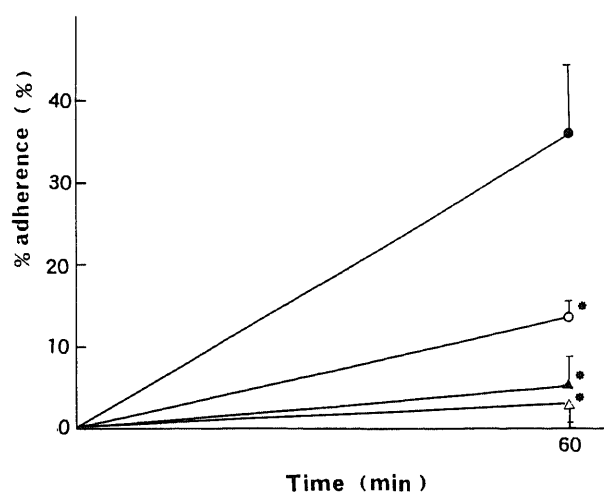


Fig. 4. Effect of the incubation temperature on the leukocyte adherence. Heparinized whole blood injected in the glass beads columns was incubated for 60 min at 37℃ (●), 23℃ (○), 4℃ (▲), and 45℃ (△). Leukocyte adherence (%) was determined as shown in Fig. 1. ($n=5$). * $p < 0.01$

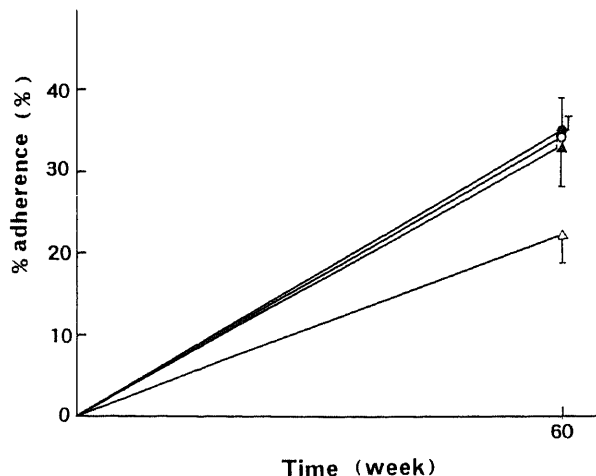


Fig. 5. Effect of speed of washing out with saline on the leukocyte adherence. Heparinized whole blood in the columns was washed out at a speed of ($n=5$) 0.3 ml/10 sec, 0.3 ml/20 sec, 0.3 ml/30 sec (●), and 0.3 ml/1 sec (○). Leukocyte adherence (%) was determined after incubation for 60 min at 37℃ as shown in Fig. 1. ($n=5$).

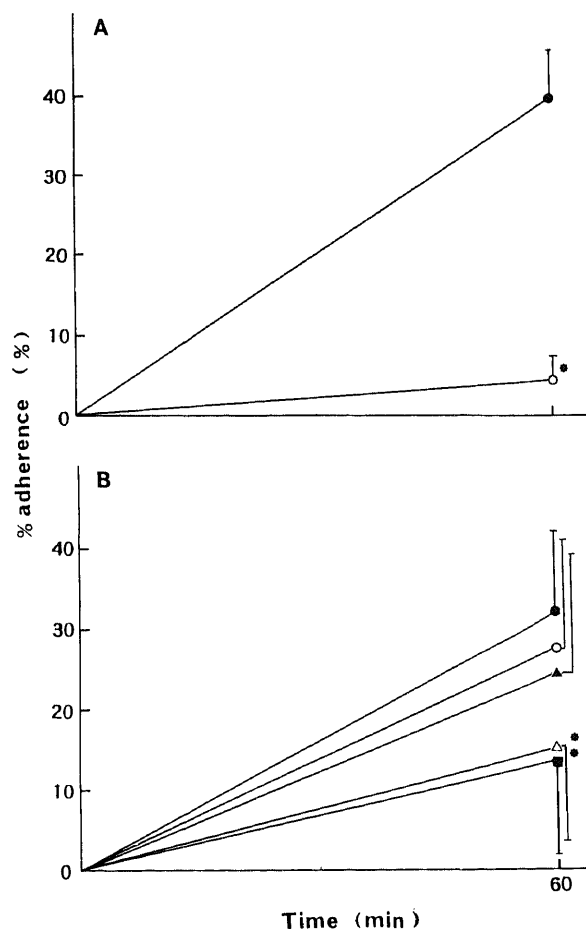


Fig. 6. Effect of calcium ion on the leukocyte adherence. ($n=7$). A, The leukocyte adherence was determined as shown in Fig. 1 for heparinized blood sample in the absence (●), or in the presence of 0.37 mM EDTA (○). B, The leukocyte adherence in the presence of excessive calcium ion. The leukocyte adherence was determined as shown in Fig. 1 in the presence of following calcium ion concentration; 0 mg/dl (●), 4 mg/dl (○), 8 mg/dl (▲), 16 mg/dl (△), and 40 mg/dl (■). * $p < 0.01$

6) NaF による影響

NaF 無添加の対照群の粘着率が $40.2 \pm 3.5\%$ であったのに比し, NaF 濃度 5mg/ml では $27.3 \pm 9.4\%$, 10mg/ml では $21.4 \pm 12.0\%$, 20mg/ml では $12.5 \pm 7.4\%$ と添加した NaF 濃度依存性に白血球粘着率は低下した(図7).

7) 各白血球分画の粘着能

粘着した白血球の絶対数では好中球が優位であったが, 各分画白血球の粘着率を比較すると, 単球($92.4 \pm 12.2\%$), 好中球($64.8 \pm 8.6\%$), 好酸球($49.6 \pm 11.5\%$), リンパ球($8.2 \pm 7.4\%$)の順を示した(図8). 以上より, 本法のガラスビーズ管を用いた粘着能の測定法では, 基本的測定条件として検体のヘパリン濃度 10u/ml, 37℃での孵置後60分ないし90分後の検体を生理的食塩水0.3ml で10秒間で洗い出す方法をとることとし

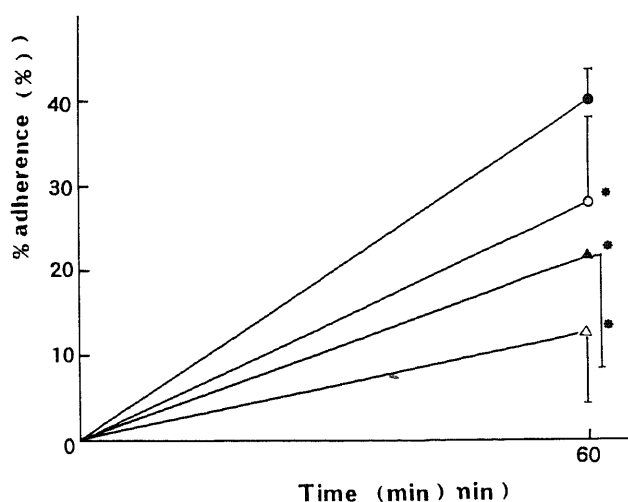


Fig. 7. Effect of sodium fluoride (NaF) on the leukocyte adherence. The leukocyte adherence was determined as shown in Fig. 1. in the presence of following NaF concentration; 0 mg/ml (●), 5 mg/ml (○), 10 mg/ml (▲), and 20 mg/ml (△). (n=5). * $p < 0.01$

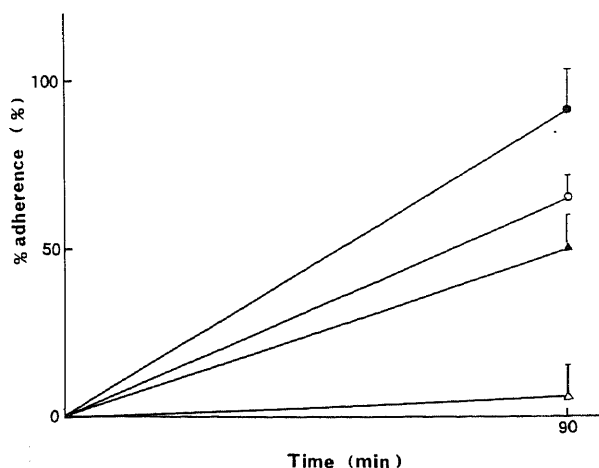


Fig. 8. Adherence of each leukocyte fraction. Specimens were prepared on the slides for heparinized whole blood washed out from the column before and after incubation for 60 min at 37℃. The specimens were stained with giemsa and estelase, and scanned by microscopy to determine the leukocyte fraction. (n=5). ●, monocytes; ○, granulocytes; ▲, eosinocytes; △, lymphocytes.

た.

2. 分離洗浄好中球における白血球粘着能の検討

PBS に再浮遊された洗浄好中球は, 37℃での孵置後数分で有意に粘着しはじめ, 30分後で $79.5 \pm 7.5\%$, 60分後で $84.1 \pm$

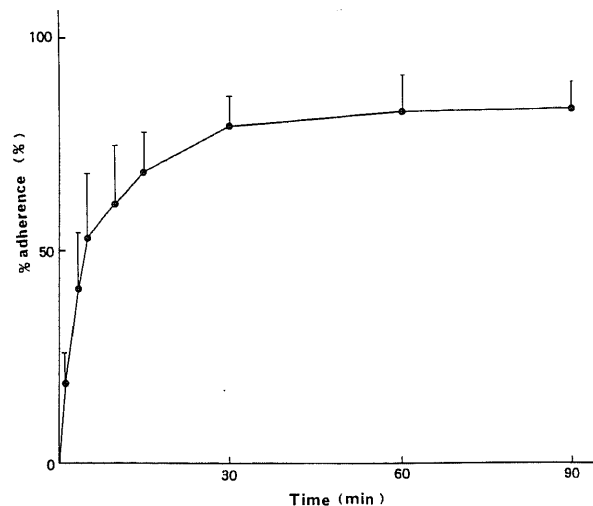


Fig. 9. Adherence of isolated and washed granulocytes in PBS. Granulocytes were separated from heparinized whole blood obtained from healthy donors by centrifugation through Ficoll-Hypaque solution. The isolated granulocytes were washed in PBS, and used as the samples for determination of the leukocyte adherence (%) as shown in Fig. 1. (n=10).

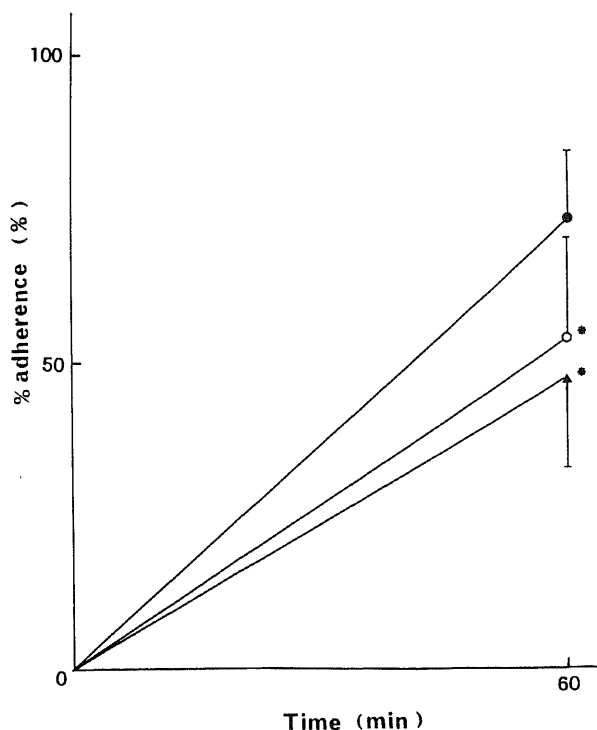


Fig. 10. Effect of serum or plasma on the adherence of isolated and washed granulocytes. The isolated and washed granulocytes prepared as shown in Fig. 9 were mixed with serum or plasma obtained from the same donors, and used to determine the leukocyte adherence (%) as shown in Fig. 1 and compared to the sample in PBS. (n=5).

8.2%と、ほぼ一定の粘着率を示した(図9). 全血での60分静置後の好中球の粘着率($64.8 \pm 8.6\%$)に比し高値であり、血小板や血中蛋白などを除去した実験系においても、有意な粘着能が認められた。また、洗浄好中球を分離した同一者の乏血小板血漿、および血清中に再浮遊させた場合の粘着率は、PBS再浮遊における粘着率に比し有意に低値($p < 0.01$)を示したが、血漿と血清の間では有意な差は認められなかった(図10)。

II. 走査型電子顕微鏡による白血球粘着の観察

全血を用いた検討では、ガラスビーズ表面上に白血球、血小板、赤血球の粘着が認められたが、白血球は血小板や赤血球の介在なしに直接粘着していることが確認された。粘着した白血球の中には、変形してガラス表面上に伸展(spreading)しているものや偽足状突起を出して粘着している像も認められた(図11)。PBSに再浮遊した好中球の粘着率は、全血に比し亢進していたが、電顕による観察でも同様な所見が確認された。一部白血球が凝集している像も認められたが、大部分は単独にガラスビーズ面に粘着していた。

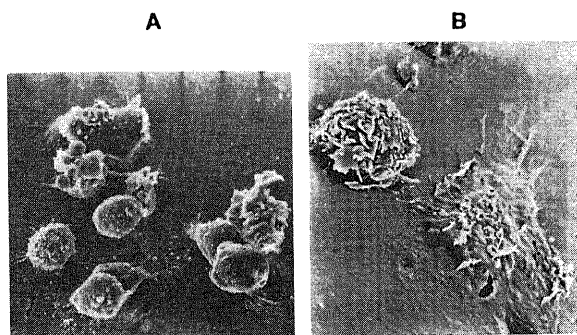


Fig. 11. Scanning electron micrographs of leukocyte adhered to glass surface. The glass beads incubated with heparinized whole blood for 60 min at 37°C in a column were prepared for observation by scanning electron microscopy. A, $\times 3,000$; B, $\times 5,000$.

III. アラキドン酸代謝阻害剤の経口投与による影響

1. 白血球粘着能の変化

1) アスピリンによる影響

アスピリン 1日 40mg の経口投与 1週間後の白血球粘着率は $30.0 \pm 2.3\%$ と、投与前の $39.2 \pm 4.0\%$ に比し有意に低下($p < 0.01$)し、投与中は低値を維持したが、投与中止後 1週間には $39.8 \pm 2.8\%$ とほぼ投与前の値に回復した(図 12A)。

2) TxA_2 合成阻害剤 (CV-4151) による影響

CV-4151 の 1日 100mg の経口投与 1週間後の白血球粘着率は $24.1 \pm 8.5\%$ と、投与前の $34.9 \pm 6.5\%$ に比し有意に低下した。しかし 2週間後では個人個人で結果にばらつきがあり、低下傾向が認められるものの、統計学的には有意差は認められなかった。薬剤投与中止 2週間後には粘着率が $34.0 \pm 8.1\%$ と、白血球粘着能は回復を示した(図 12B)。

3) TxA_2 受容体拮抗剤 (AA-2414) による影響

AA-2414 1日 20mg の経口投与では、白血球粘着能は $38.2 \pm 10.0\%$ から $24.0 \pm 13.7\%$ と有意に低下($p < 0.01$)した(図 12C)。

2. TxA_2 産生能, PGI_2 濃度の変化

1) アスピリンによる影響

TxA_2 産生能を反映すると考えられる血清中 TxB_2 濃度は、アスピリン経口投与により著明に低下し、投与前の値を 100% とすると、前値の 6~7% と有意に低下($p < 0.001$)したのに対し、 PGI_2 濃度を反映すると考えられる血漿 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ の濃度は、前値の 60~70% にとどまり、統計学的には有意差は認められなかった(図 13A)。両者とも薬剤投与中止後 1週間で、前値の程度まで回復した。

2) TxA_2 合成阻害剤 (CV-4151) による影響

CV-4151 の投与でも、 TxB_2 濃度は有意に低下($p < 0.001$)したが、投与前値の 20~30% の低下で、アスピリン 1日 40mg の経口投与群に比し軽度であった。6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 濃度は全体的には増加傾向を示したが、個人個人の結果にばらつきが大きく、統計学的な有意差は認められなかった。また、薬剤投与 1週間後に比し、2週間後では 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 濃度の増加は軽度

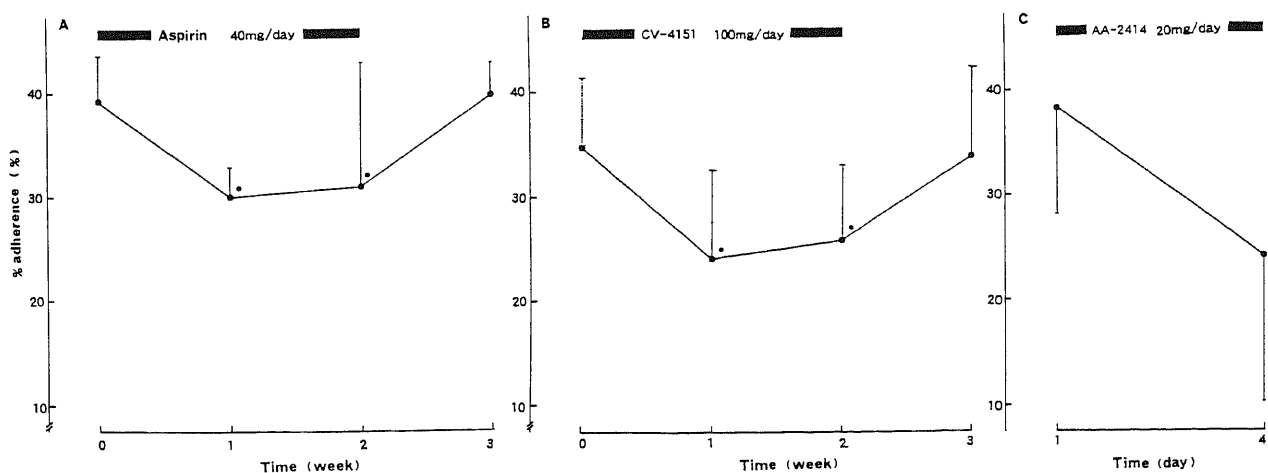


Fig. 12. Effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on the leukocyte adherence. A, A low-dose of aspirin (40 mg daily) was administered to normal blood donors for two weeks ($n=10$). The blood samples were taken before, or after the start of the administration as shown in the figure (abscissa). The leukocyte adherence was determined as shown in Fig. 1. B, A TxA_2 synthetase inhibitor (CV-4151) (100 mg daily) was administered to normal blood donors for two weeks as shown in the figure ($n=6$). * $p < 0.05$ C, A TxA_2 receptor antagonist (AA-2414) (40 mg daily) was administered to normal blood donors for four days as shown in the figure ($n=6$). * $p < 0.01$

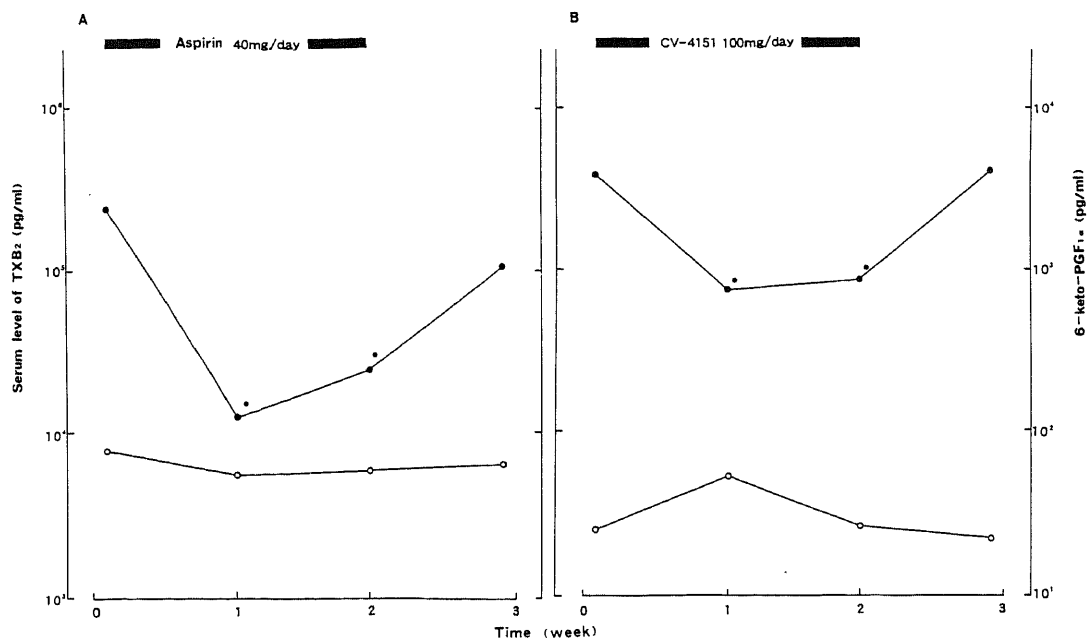


Fig. 13. Effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on the serum level of TxB₂ and the plasma level of 6-keto-PGF_{1α}. A, A low-dose of aspirin (40 mg daily) was administered to normal blood donors for two weeks (n=10). * p<0.001. The blood samples were taken before, or after the start of the administration as shown in the figure (abscissa). The serum level of TxB₂ (●), and the plasma level of 6-keto-PGF_{1α} (○) were determined. B, A TxA₂ synthetase inhibitor (CV-4151) (100 mg daily) was administered to normal blood donors for two weeks (n=6). * p<0.001.

考 察

動脈硬化症や血栓症の進展においても、単球や好中球が重要な作用を有することが明らかになり、近年白血球のレオロジーも注目をあびている。動脈硬化により引き起こされる最初の形態的变化は動脈内皮の損傷で、内皮のコラーゲン、エラスチン線維、微小フィブリン、線維芽細胞が血液に露呈されると、血中の血小板、白血球が粘着を起こし、血栓形成巣をつくる⁷⁾と考えられる。その後、血管壁や血小板の他、マクロファージから放出される平滑筋細胞増殖因子が動脈硬化を進展させる¹²⁾ことや、好中球から放出される蛋白分解酵素や活性酸素、アラキドン酸代謝産物などが、さらに血管内皮障害を増悪させる³¹³⁾ことも報告されている。血液凝固学的にも、白血球エラスターゼなどの白血球由来物質が凝固線溶の促進あるいは抑制に関与していること¹⁴⁾が明らかになり、広範囲に及ぶ白血球の作用が改めて認識されているが、ここでは白血球粘着能を中心に、その粘着調整因子の一つと考えられるアラキドン酸代謝産物のうち、特に TxA₂ と白血球粘着能との関連について検討した。まず、従来の血小板粘着能測定用のガラスビーズ管を用いて、新たに白血球粘着能の定量的測定方法を考案し、粘着能に影響を及ぼす種々の因子について検討した。

ヘパリンを加えた全血を用いた検討では、37℃での孵置で経時的に白血球粘着率は増加し、ほぼ60分で一定の粘着率を示したが、添加したヘパリンの濃度依存性に白血球粘着率は低下した。ヘパリンは、アンチトロンビンⅢの抗凝固活性を促進する以外に、補体系のカスケードも阻害する作用を有し、補体や免疫複合体などで活性化された白血球の血管内皮への粘着を抑制する¹⁵⁾という報告もあるが、反対にヘパリンはウサギの好中球の粘着能を亢進させ、試験管内で白血球減少をきたす¹⁶⁾という

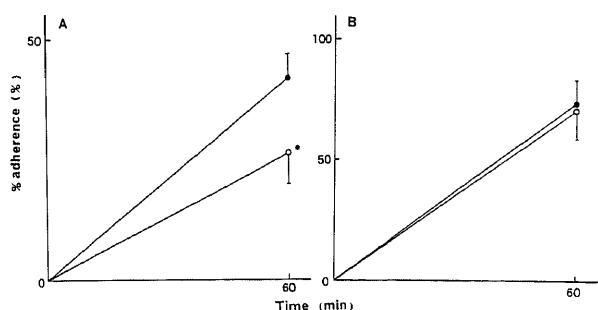


Fig. 14. Effect of aspirin added in vitro on the leukocyte adherence. A, Heparinized whole blood was incubated in the absence (●) or in the presence of 10 mM aspirin (○) for 30 min at 37°C, and then treated for determination of leukocyte adherence as shown in Fig. 1 (n=5). B, Isolated and washed granulocyte in PBS was incubated in the absence (●) or in the presence of 10 mM aspirin (○) for 30 min at 37°C, and treated for determination of leukocyte adherence as shown in Fig. 1 (n=5).

で、投与中止後2週間では、投与前の値に比べ低下する傾向が認められた(図 13B)。

3) TxA₂ 受容体拮抗剤 (AA-2414) による影響

AA-2414 の1日 20mg の経口投与により、TxB₂ 濃度、6-keto-PGF_{1α} 濃度の有意な変化は認められなかった。

IV. 試験管内におけるアスピリンの影響

アスピリンを全血に添加した場合、好中球粘着能は有意に低下 (p<0.01) したのに対し、好中球浮遊液に添加した場合、有意な変化は認められなかった(図14)。

報告もあり、その詳細は明らかではない。今回の検討ではヘパリン濃度が非常に高濃度なため、血液の pH などの性状を変化させたことが、直接白血球に影響を与えた可能性も考えられ、今後の検討が必要と思われる。

孵置温度の検討では、生体内と同じ 37°C での粘着率が 4°C 、 25°C に比し高値を示したことから、白血球の生物学的活性が必要であることが示唆され、また、 45°C での孵置での粘着能が低下することから、白血球の膜蛋白の性状が粘着能に関与していることが予想される。最近、白血球の粘着に関与している膜蛋白が解明され、これまでに白血球細胞膜表面に存在する三種類の粘着蛋白が発見されている。モノクローナル抗体による解析で解明されたこれらの蛋白分子はリンパ球機能関連抗原-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1), Mac-1 (OKM-1, Mo-1), P150-95 といわれる¹⁷⁾。これらの分子はいずれも α , β 鎖の 2 本のサブユニットから成り、 β 鎖は全てに共通である。クラスタードeterminant (cluster determinant, CD) 番号では、LFA-1 α が CD 11a, Mac-1 α が CD 11b, P150-95 α が CD 11c となり、共通の β 鎖が CD (w) 18 と呼称される。これらはフィブリノゲン、フォンウィルブラント因子、フィブロンectinなどの接着蛋白と同様にアルグニン-グリシン-アスパラギン酸配列を持つインテグリンファミリーに属している。LFA-1 は全ての白血球に発現され、細胞障害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞の標的細胞への接着や、白血球凝集の機能を担っている。Mac-1 は好中球や単球に発現され、リンパ球に発現されないのが特徴で、好中球の粘着の他、遊走能、貪食能、凝集能といった機能を司り、補体 (C3b) の受容体でもあるとされている。P150-95 も好中球や単球の他、一部のリンパ球に発現され、機能的にはほぼ Mac-1 と同様と言われている。

一方、血管内皮細胞にはこれらのリガンドとして細胞内接着分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) や、血管内皮白血球接着分子-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1) といった糖蛋白質が発見されている。ICAM-1 は LFA-1 のリガンドで、ほぼ全ての組織の細胞表面に正常状態でも分布している¹⁸⁾。内皮細胞がエンドトキシンやインターロイキンなどの刺激を受けると、ICAM-1 の発現の増加とともに、ELAM-1 が発現し、これらが白血球粘着能を亢進させると考えられている¹⁹⁾。

臨床的には、生下時から反復する重症細菌感染症をきたす好中球機能不全症の病態を示す白血球粘着蛋白異常症 (アンカー病) が報告されている²⁰⁾。この疾患では、好中球系細胞の血管壁や組織への粘着欠損により、いわゆる好中球の組織内貯留 (marginal pool) が起こらないために末梢白血球数が異常高値を示し、粘着の他、遊走、貪食不全も伴うが、いずれもその膜蛋白欠損が原因であることが明らかにされている。上記疾患患者が動脈硬化や血栓症を併発するかどうかは興味あるところであるが、長期生存例が乏しいため、その評価は困難と思われる。

白血球粘着には、エネルギーに依存する能動的なものと、非依存的な受動的なものがある²¹⁾ といわれている。我々の検討では、強力な解糖系阻害剤である NaF の添加により、白血球粘着率が著明に抑制されたことから、白血球粘着は解糖系エネルギーに依存している部分が多いことが示唆された。基礎実験の段階で、採血後長時間放置した検体では白血球粘着能は低下したが、これもエネルギー依存性の部分が多い結果と考えら

れる。

もうひとつ、 Ca^{2+} が白血球粘着に不可欠であることは、EDTA の添加により血液検体の Ca^{2+} をキレート化した時に白血球粘着率が低下したことにより明らかであるが、反対に Ca^{2+} 過剰状態でも粘着能は低下傾向を示した。生体内では実験系で用いたような高カルシウム濃度をきたすことはないが、 Ca^{2+} が白血球粘着能の恒常性を調整する一因子である可能性が考えられた。

全血を用いた検討での各白血球分画の粘着能の比較で、動脈硬化や血栓症の進展に関与が大きいとされている単球、好中球の粘着能が高いことは臨床的にも大変興味深い。この実験系では血小板や赤血球の血球成分の他、血漿蛋白などの影響が考えられるため、ヘパリン血より好中球のみを分離洗浄し、PBS に再浮遊させて粘着能を測定したところ、全血での好中球粘着率に比し有意に高値を示した。この結果より、好中球の粘着には血小板や血漿蛋白などの存在は不可欠ではないと考えられた。しかし、分離洗浄した好中球を再び乏血小板血漿や血清に再浮遊した時の粘着率がリン酸緩衝液に再浮遊した場合に比し有意に低値を示したことから、血漿や血清中に白血球粘着能を調節し安定化させる何らかの物質が含まれることが示唆される。このうち血漿蛋白が白血球粘着能に影響を及ぼすという報告²²⁾ が見受けられ、フィブリノゲンの存在が白血球粘着能のみならず凝集能や赤血球、血小板の凝集能も亢進させる可能性が報告されている^{23,24)}。フィブリノゲンは生体内に炎症が起きた時などに増加する急性期反応性蛋白の一つで、最近はその血中濃度の増加自体が独立した血栓症の危険因子の一つと考えられ²⁵⁾、単球などと結合して凝固活性を亢進させる方向に作用することが報告されている²⁶⁾。このことは、血栓中に血小板だけでなく多数の白血球が含まれていることの説明として、単に白血球が血栓中に補足されたものでなく、フィブリノゲンとともに血栓形成に能動的に作用していると考えると理解しやすい。

血小板や血管内皮細胞の膜表面に存在する磷脂質から遊離したアラキドン酸は、各種酵素を介して代謝され、血小板では主に TxA_2 が、血管内皮細胞では PGI_2 が産生される。この TxA_2 には強力な血小板凝集作用並びに血管収縮作用があり、止血という作用の反面、血栓形成を促進させる作用のあることが知られている。一方、 PGI_2 には血小板凝集阻止作用や血管拡張作用という TxA_2 と相反する作用があり、生体内では生理的あるいは病的状態で両者のバランスが重要な意義をもつと考えられる。糖尿病や不安定狭心症では、 PGI_2 に対する TxA_2 産生の比が増加しており^{27,28)}、このバランスの乱れが動脈硬化症や血栓症の病因や増悪因子の一つであると考えられている²⁹⁾。白血球のうち好中球では、アラキドン酸から主としてリポキシングナーゼ経路によりロイコトリエン B_4 (leukotriene B_4 , LTB_4) や 5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (5-hydroxyeicosatetraenoic acid, 5-HETE) が産生される³⁰⁾ が、微量の TxA_2 や PGI_2 が産生されることも報告されている³⁰⁾。単球では 5-HETE, LTB_4 , LTC_4 の他にサイクロオキシゲナーゼ経路も発達しているため、 TxA_2 産生が認められる²⁹⁾ が、後述する TxA_2 の白血球粘着能促進作用を考えあわせると、単球が白血球の中で最も高い粘着能を有することに関連があるように思われる。また、血小板と白血球の相互作用により、好中球が血小板での 12-HETE や TxA_2 産生を阻害³¹⁾ したり、血小板の存在下で好中球の PGI_2 や LTB_4 産生が増加³²⁾ したりするほか、血小板で産生されたプロ

スタグランジン H_2 (prostaglandin H_2 , PGH_2) や LTA_4 が内皮細胞に取り込まれ、 PGI_2 や LTB_4 に転換されるなど、各細胞間をアラキドン酸代謝産物が自由に行き交うスチール (steal) 現象³³⁾ が観察されている。このようなアラキドン酸代謝産物の細胞間での相互作用の存在は、それぞれの代謝産物の作用が多岐多方面に渡っている事を示し、生体内での微妙な恒常性の維持機構は極めて複雑なものと想像される。

白血球と血小板の相互作用を白血球粘着能の点から考えると、粘着の際に血小板自体の介在が必要でない事を先に述べたが、トロンビン刺激を受けた血小板に選択的に好中球や単球が結合すること³⁴⁾ や、血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor, PDGF) に好中球、単球の走化性亢進作用が認められること³⁵⁾ から、なんらかの刺激で血小板が活性化されると、血小板自体も凝集して血栓形成を進めて行くと同時に、白血球を局所に遊走させて血小板上に結合させ、血小板、白血球から産生されるアラキドン酸代謝産物の刺激によりさらに粘着凝集が促進されて血栓形成を確実なものにして行く過程が想像される。近年、脳梗塞や心筋梗塞の発症予防に用いられるアスピリン^{36,37)} は、血小板のサイクロオキシゲナーゼを阻害し、流血中の血小板及び一部の巨核球の TxA_2 産生を不可逆的に阻害することを利用したものであるが、一方血管壁のサイクロオキシゲナーゼも阻害することから、 PGI_2 産生も抑制し、この点では血栓形成の方向にも作用する可能性が考えられ、これがいわゆるアスピリンジレンマと呼ばれるものである。近年、血管壁に比し、血小板のサイクロオキシゲナーゼがアスピリンにより感受性が高いことを利用し、1日 20~100mg 程度の少量のアスピリン投与が試みられ、血小板のサイクロオキシゲナーゼを選択的に阻害し得るという報告^{38)~40)} がなされている。また、もう一つのアスピリンジレンマの打開策として、 TxA_2 合成阻害剤 (thromboxane A_2 synthetase inhibitor, $TxSI$)⁴¹⁾ や TxA_2 受容体拮抗剤 (thromboxane A_2 receptor antagonist, $TxRA$) が開発され、現在様々の分野で臨床効果が検討されている。今回我々の試みたアスピリン 1日 40mg, $TxSI$ である CV-4151 1日 100mg, $TxRA$ である AA-2414 1日 20mg の投与では、いずれも白血球粘着能は有意に低下を示した。 TxA_2 産生能は、前二者の投与で著明な低下を示し、一方 PGI_2 産生はアスピリン投与では低下するものの TxA_2 産生能の低下に比し軽度で、投与前の80%程度にしか抑制されず、血栓形成阻止に優位な方向への作用が期待された。 $TxSI$ である CV-4151 の投与では、 PGI_2 産生の変化は個人差が大きいため有意差は認められなかったが、全体的には増加傾向が認められた。これは、血小板の PGH_2 から PGI_2 へ転化される量が増加したためと考えられるが、このことも血栓予防の方向に作用する可能性が考えられる。白血球粘着能にアラキドン酸代謝産物が影響するとの報告はあり、アラキドン酸代謝阻害剤としてアスピリンやブレドニゾロンの経口投与⁴²⁾ や、好中球浮遊液へのアスピリンやインドメサシンの添加により、白血球粘着能が低下する⁴³⁾ という報告がなされているが、その詳細についてはさまざまな見解があり未だ明らかになっていない。一般にアラキドン酸代謝経路のリポキシゲナーゼ系では LTB_4 ⁴⁴⁾ や LTC_4 , LTD_4 ⁴⁵⁾ は白血球粘着能を促進させるとされ、サイクロオキシゲナーゼ系では、エンドトキシン刺激による好中球の TxA_2 産生が粘着能を促進する⁴⁶⁾ とか、 PGI_2 が好中球粘着能を抑制する⁴⁷⁾ という報告も見受けられる。今回の我々の検討では、アスピリン、 $TxSI$, $TxRA$ の経

口投与により白血球粘着能が低下したことから、種々のアラキドン酸代謝産物のうち少なくとも TxA_2 には白血球粘着能を促進させる作用のあることが明らかとなった。また、好中球の PBS 浮遊液にアスピリンを添加しても粘着能は低下せず、全血に添加した場合にのみ粘着能が低下したことから、血小板あるいは血漿成分の存在下でのみアスピリンが作用することが示唆され、血小板のアラキドン酸代謝が白血球粘着能により強い影響を与えている可能性や、血小板と白血球の相互作用、あるいは血液中の蛋白などの何らかの因子がアラキドン酸代謝のバランスを修飾している可能性が考えられた。

以上より、白血球は単独で粘着能を有するものの、血小板や血漿蛋白などと複雑な相互作用を有し、それらが密接に白血球粘着能を調整していると思われる。このうち血小板や白血球から産生されるアラキドン酸代謝産物の1つである TxA_2 に白血球粘着能を亢進させる作用のあることが示唆された。また、少量アスピリン、 $TxSI$, $TxRA$ などのアラキドン酸代謝阻害剤の投与は、血小板機能のみならず白血球粘着能を抑制することにより、動脈硬化や血栓症の進展を阻止し得る可能性が示唆された。

結 論

ガラスビーズ管を用いた白血球粘着能の定量的測定法を考案し、各種条件下での白血球粘着能の変化を測定した。次に健常者に種々のアラキドン酸代謝阻害剤を経口投与し、その白血球粘着能の変化により、 TxA_2 の白血球粘着能に及ぼす影響を検討した。

1. 本法の健常者全血 (ヘパリン血) を用いた白血球粘着率は約60分で一定値 ($40.7 \pm 3.4\%$) に達し、各白血球分画の粘着率は、単球、好中球、好酸球、リンパ球の順に高値を示した。

2. 白血球粘着には、カルシウムイオンや解糖系エネルギーが必要であることが示唆された。

3. 分離洗浄好中球も、全血中の好中球と同様に粘着能を有し、白血球粘着には血小板や血漿蛋白などが直接的には不可欠ではないことが示唆された。走査型電子顕微鏡による観察においても、好中球が直接、ガラス表面上に粘着していることが確認された。

4. 分離洗浄好中球を、再び乏血小板血漿や血清中に浮遊させた状態の粘着率は、PBS に浮遊させた状態の粘着率より低値を示すことから、血漿や血清中に白血球粘着能を調整する因子が存在する可能性が示唆された。

5. 健常者に各々、アスピリンを1日 40mg, TxA_2 合成酵素阻害剤 (CV-4151) を1日 100mg, TxA_2 受容体拮抗剤を1日 20mg 連日投与し、その前後の白血球粘着率の変化を測定したところ、いずれの薬剤投与後にも白血球粘着率は有意に低下したことから、 TxA_2 には白血球粘着能を亢進させる作用のあることが示唆された。

6. アスピリン投与後の TxA_2 産生能は著明に低下したのに対し、 PGI_2 産生能の低下は軽度であった。 TxA_2 合成酵素阻害剤の投与では、 TxA_2 産生能はアスピリン投与群に比し軽度ではあるが有意に低下した。 PGI_2 産生能は個体差が大きく、全体的には増加傾向を示した。 TxA_2 受容体拮抗剤の投与では、 TxA_2 産生能、 PGI_2 産生能とも有意な変化は認められなかった。

7. 本法は試験管内での白血球粘着能を定量的に測定する方法として、簡易かつ迅速に行え、薬剤などの白血球粘着能への

影響を調べる上でも有用な方法であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました松田 保教授に深く感謝の意を表します。また、本研究に際して御助言、御協力をいただきました金沢大学内科学第三講座教室員の各位に厚く御礼申し上げます。なお、本論文の一部は第8回国際レオロジー学会(1992年横浜)において発表した。

文 献

- 1) Harlan, J. M.: Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*, **65**, 513-525 (1985).
- 2) Faggiotto, A., Ross, R. & Harker, L.: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. *Atherosclerosis*, **4**, 323-356 (1984).
- 3) Harlan, J. M., Killen, P. D., Harker, L. A. & Striker, G. E.: Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1394-1403 (1981).
- 4) Sato, T., Takabayashi, S. & Kohchi, K.: Increased subendothelial filtration of the coronary arteries with monocytes/macrophages in patients with unstable angina; histological data on 14 autopsied patients. *Atherosclerosis*, **68**, 191-197 (1987).
- 5) Ernst, E., Matrai, A. & Paulsen, F.: Leukocyte rheology in recent stroke. *Stroke*, **18**, 59-62 (1987).
- 6) Hansen, L. K., Grimm, R. H. Jr. & Neaton, J. D.: The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. *Int. J. Epidemiol.*, **19**, 881-888 (1990).
- 7) Ross, R.: Atherosclerosis; a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Atherosclerosis*, **1**, 293-311 (1981).
- 8) Holt, P. G.: The LAI microtest; a rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell mediated immunity in vitro. *J. Immunol. Methods*, **8**, 277-288 (1975).
- 9) Urist, M. M. & Boddie, A. W.: Capillary tube leukocyte adherence inhibition; an assay for cell-mediated immunity in cancer patients. *Int. J. Cancer*, **17**, 338-341 (1976).
- 10) Kelly, M. K. & Thong, Y. H.: Human monocyte adherence measured by the nylon fiber microcolumn technique. *J. Immunol. Methods*, **74**, 345-351 (1984).
- 11) MacGregor, R., Macarak, E. J. & Kefalides, N. A.: Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon fiber. *J. Clin. Invest.*, **61**, 697-702 (1978).
- 12) Ross, G. G.: Role of the monocyte in atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **103**, 181-200 (1981).
- 13) Dahlen, S., Bjork, J., Hedqvist, P., Artors, K., Hammarstorm, S., Lindgren, J. & Samuelsson, B.: Leukotriene promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 3887-3892 (1981).
- 14) 松田 保: t-PA, 第1版, 36-46 頁, ラフサイエンス, 東京, 1991.
- 15) Cario, M. S., Allen, J., Higgins, C., Baehner, R. L. & Boxer, L. A.: Synergistic effect of heparin and chemotactic factors on polymorphonuclear leukocyte aggregation and degranulation. *Am. J. Pathol.*, **113**, 67-74 (1983).
- 16) Lafuze, J. E., Haak, R. A., PAO-LO-YU & Baehner, R. L.: In vivo and in vitro effects of heparin on polymorphonuclear leukocytes. *Fed. Proc.*, **43**, 973 (1984).
- 17) Ziemmerman, G. A. & McIntyne, T. M.: Neutrophil adherence to human endothelium in vitro occurs by CDw18 (Mo1, MAC-1/LFA-1/GP150-95) glycoprotein-dependent and -independent mechanism. *J. Clin. Invest.*, **81**, 531-537 (1988).
- 18) Kishimoto, T. K. & Springer, T. S.: Molecular analysis of human leukocyte adhesion deficiency. *Jpn. J. Clin. Immun.*, **11**, 428-434 (1988).
- 19) Schmalstieg, F. C.: Leukocyte adherence defect. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **7**, 867-872 (1988).
- 20) 小林邦彦: 白血球粘着蛋白異常症. 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 635-637 (1988).
- 21) Thong, Y. H. & Currell, J. M.: Development of a microassay technique for neutrophil adherence. *J. Immunol. Methods*, **63**, 229-236 (1983).
- 22) Musson, R. A. & Henson, P. M.: Humoral and formed elements of blood modulate the response of peripheral blood monocytes; plasma and serum inhibit and platelets enhance monocyte adherence. *J. Immunol.*, **122**, 2026-2031 (1979).
- 23) Phair, J. P., Bassaris, H. P. & Morlock, B. A.: Fibrinogen enhances complement-mediated argumentation of retention of polymorphonuclear leukocytes by nylon columns. *Intec. Immun.*, **33**, 503-506 (1981).
- 24) Berliner, S., Fuchs, J., Seligsohn, U., Kariv, N., Hazaz, B., Rotenberg, Z., Weinkenger, I., Agmon, J. & Aronson, M.: Possible role of fibrinogen in the aggregation of white blood cells. *Thromb. Haemost.*, **58**, 749-752 (1987).
- 25) Handa, K., Kono, S., Saku, K., Sasaki, J., Kawano, T., Sasaki, Y., Hiroki, T. & Arakawa, K.: Plasma fibrinogen levels as an independent indicator of severity of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **77**, 209-213 (1989).
- 26) Altieri, D. C., Mannucci, P. M. & Capitaro, A. M.: Binding of fibrinogen to human monocytes. *J. Clin. Invest.*, **78**, 968-976 (1986).
- 27) Udvardy, M., Torok, I. & Rak, K.: Plasma thromboxane and prostacyclin metabolite ratio in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, **47**, 479-484 (1987).
- 28) Zahavi, M., Zahavi, J., Schafer, R., Firsteter, E. & Laniado, S.: Abnormal pattern of platelet function and thromboxane generation in unstable angina. *Thromb. Haemost.*, **62**, 840-845 (1989).
- 29) Rush, D. S., Kerstein, M. D., Bellan, J. A., Knoop, S. M., Mayeux, P. R., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J. & McNamra, D. B.: Prostacyclin, thromboxane A_2 and prostaglandin E_2 formation in atherosclerotic human carotid artery. *Atherosclerosis*, **8**, 73-78 (1988).

- 30) Gerrard, J. M.: Prostaglandins and Leukotrienes. Blood and Vascular Cell Function, 1st ed., p77-278, Marcel Dekker, New York, 1985.
- 31) Oudinet, J. R., Sraer, J., Bens, M. & Ardaillou, R.: Influence of polymorphonuclear leukocytes on the metabolism of arachidonate in human platelets. *Thromb. Haemost.*, **60**, 59-62 (1988).
- 32) Dinerman, J., Mehta, Lawson, D. & Mehta, P.: Enhancement of human neutrophil function by platelets; effects of indomethacin. *Thromb. Res.*, **49**, 509-517 (1988).
- 33) 藤田 浩, 室田誠逸: 血小板, 白血球と血管内皮細胞の相互反応とプロスタグランジン. *実験医学*, **8**, 63-69 (1990).
- 34) Jungi, T. W., Spycher, M. O., Nydegger, V. E. & Barandun, S.: Platelet-leukocyte interaction; selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes and related cell lines. *Blood*, **67**, 629-636 (1986).
- 35) Denel, T. F., Senior, R. M., Huang, J. S. & Griffin, G. L.: Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J. Clin. Invest.*, **69**, 1046-1049 (1989).
- 36) 松田 保: TIA, 脳虚血とアラキドン酸代謝. *老年医学*, **25**, 991-998 (1989).
- 37) Steering Committee of the Physician's Health Study Research Group: Final report on the aspirin component of the ongoing physician's health study. *N. Eng. J. Med.*, **321**, 129-135 (1989).
- 38) Knapp, H. R., Healy, C., Lawson, J. & Fitzgerald, G. A.: Effects of low-dose aspirin on endogenous eicosanoid formation in normal and atherosclerotic man. *Thromb. Res.*, **50**, 377-386 (1988).
- 39) Tohgi, H., Tamura, K., Kimura, B., Kimura, M. & Suzuki, H.: Individual variation in platelet aggregability and serum thromboxane B₂ concentrations after low-dose aspirin. *Stroke*, **19**, 700-703 (1988).
- 40) Kyrle, P. A., Minar, E., Brenner, B., Eichler, H. G., Heisteringer, M., Marosi, L. & Lechner, K.: Thromboxane A₂ and prostacyclin generation in the microvasculature of patients with atherosclerosis effect of low-dose aspirin. *Thromb. Haemost.*, **61**, 374-377 (1989).
- 41) Skrinska, V. A., Konieczkowski, M., Gerrity, R. G., Galang, C. F. & Robec, M. V.: Suppression of foam cell lesions in hypercholesterolemic rabbits by inhibition of thromboxane A₂ synthesis. *Atherosclerosis*, **8**, 359-367 (1988).
- 42) MacGregor, R. R., Spagnulo, P. J. & Lentnek, A. L.: Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, predonison, and aspirin measured with an assay system. *N. Eng. J. Med.*, **291**, 642-646 (1974).
- 43) Buchanan, M. R., Vazquez, M. J. & Gimbrone, M. A. Jr.: Arachidonic acid metabolism and the adhesion of human polymorphonuclear leukocytes to cultured vascular endothelial cells. *Blood*, **62**, 889-895 (1983).
- 44) Palmblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A. M., Radmark, O., Engstedt, L. & Samuelsson, B.: Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*, **58**, 658-661 (1981).
- 45) Goetzl, E. J., Brindley, L. L. & Goldman, D. W.: Enhancement of human neutrophil adherence by synthetic leukotriene constituents of the slow-reacting substance of anaphylaxis. *Immunology*, **50**, 35-41 (1983).
- 46) Spagnulo, P. J., Ellner, J. J., Hassid, A. & Dunn, M. J.: Thromboxane A₂ mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J. Clin. Invest.*, **66**, 406-414 (1980).
- 47) Boxer, L. A., Allen, J. M., Schmidt, M., Yoder, M. & Baehner, R. L.: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence by prostacyclin. *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 672-678 (1980).

A Novel Method to Assess Leukocyte Adherence and the Effect of Thromboxane A_2 on Leukocyte Adherence
Chika Uotani, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 946—957 (1993)

Key words leukocyte adhesion, platelet, atherosclerosis, aspirin, thromboxane A_2

Abstract

Adhesion of Leukocytes to vascular endothelium plays important roles in the development of atherosclerosis and/or thrombosis. Leukocyte adherence was assessed by a novel method using a plastic tube containing fine glass beads, and changes in leukocyte adherence were examined under various reaction conditions. 0.3 ml of heparinized blood obtained from healthy donors was injected into glass bead columns and incubated at 37°C . The blood in the column was washed out with 0.3 ml of saline at a flow rate of 0.1 ml/sec. Numbers of leukocytes were determined in the washed-out fluid (B, the leukocytes not adhered to the column) and were compared with those in the blood applied to the column (A). The percentage of leukocyte adherence was calculated by the formula, $(A-B)/A \times 100\%$. Adhesiveness of each leukocyte fraction was studied using giemsa and esterase stainings. Leukocyte adherence increased with time and reached a plateau level after 60 minutes of incubation ($40.7 \pm 3.4\%$). Adhesiveness of each leukocyte fraction was high in the following order; monocyte, granulocyte, eosinocyte and lymphocyte. Leukocyte adherence was suppressed by the addition of calcium chelator or inhibitor of glycolysis, which suggested that calcium ion or energy from glycolysis was necessary for leukocyte adherence. Granulocytes washed in phosphate-buffered saline (PBS) and which were separated from heparinized blood adhered at the same level, indicating that leukocyte did not require platelet or plasma to adhere to a glass surface. Scanning electron micrography showed granulocytes to be spread and adhering directly to a glass surface with pseudopods. Leukocyte adherence decreased significantly in healthy volunteers on administration of aspirin (40 mg daily), thromboxane synthetase inhibitor (TxSI) (CV-4151, 100 mg daily) or thromboxane receptor antagonist (TxRA) (AA-2414, 20 mg daily). Concentration of thromboxane B_2 (Tx B_2) in serum, which reflects production of thromboxane A_2 (Tx A_2) markedly decreased, whereas changes in the level of 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$), which reflects production of prostacyclin (PGI $_2$), was moderate following the start of aspirin ingestion. After the ingestion of TxSI, production of Tx A_2 decreased too, but production of PGI $_2$ tended to increase. From these results, it was concluded that this method can assess in vitro leukocyte adherence easily and rapidly, and it was suggested that Tx A_2 has a function in the increase of leukocyte adherence activity.